

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS CURITIBANOS

CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS

GABRIELA FOSSATTI

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E
ENRAIZAMENTO POR ESTAQUIA DE TRÊS VARIEDADES DE OLIVEIRA (*Olea
europaea* L.)**

Curitibanos

Junho / 2017

GABRIELA FOSSATTI

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E
ENRAIZAMENTO POR ESTAQUIA DE TRÊS VARIEDADES DE OLIVEIRA (*Olea
europaea* L.)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia,
do Campus de Curitibanos, da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco

Curitibanos

Junho / 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fossatti, Gabriela

Desenvolvimento de técnicas de estabelecimento in vitro
e enraizamento por estaquia de três variedades de oliveira
(*Olea europaea* L.) / Gabriela Fossatti ; orientador, Lírío
Luiz Dal Vesco, 2017.

37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2017.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Micropropagação. 3. Estaquia. 4. *Olea
europaea*. 5. Cultura de tecidos. I. Dal Vesco, Lírío Luiz.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
GABRIELA FOSSATTI

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E
ENRAIZAMENTO POR ESTAQUIA DE TRÊS VARIEDADES DE OLIVEIRA (*Olea
europaea* L.)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 23 de junho de 2017.

Prof. Dr. Samuel L. Fioreze
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lírío Luiz Dal Vesco
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leocir José Welter
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter tornado tudo isso possível e sempre ter depositado sobre mim suas bênçãos, e sua fé, é força que me faz continuar a lutar por todos os meus sonhos e projetos.

A minha família, pais e irmãos, que sempre serão referências de cuidado e dedicação, por ter me dado o suporte necessário para a conclusão deste curso e sempre acreditar e investir no meu potencial.

Ao meu namorado, obrigado de forma especial por todo carinho, paciência, compreensão e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre.

Ao meu orientador Drº. Profº. Lírío Luiz Dal Vesco, pelo suporte no tempo que lhe coube, pelas batalhas diárias, suas correções, incentivos e pelos ensinamentos transmitidos durante toda minha jornada nesta universidade, assim como toda ajuda para construir grande parte dos conhecimentos para minha vocação profissional.

Aos técnicos Renata Almeida Schmidt e Gabriel Felip Gomes Olivo, pela orientação, prestatividade e carinhoso apoio que tornaram a rotina mais leve e agradável.

A Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Curitibanos, pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado, saibam que foram essenciais para o meu engrandecimento pessoal e profissional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Croqui de distribuição das repetições e tratamentos no enraizamento por estaquia das variedades: Arbosana, Arbequina e Koroneiki referente ao ensaio 1. (UFSC, Campus de Curitibanos, 2017). 16

Figura 2 - Estratégias de estabelecimento *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **A)** Mudanças jovens de oliveira recebidas do CEPAF/EPAGRI, Chapecó (SC) e mantidas em casa de vegetação; **B)** Detalhe da identificação das três variedades: Arbequina, Arbosana e Koroneiki. **C)** Transplante das mudas para vasos maiores com identificação individual; **D)** Ambiente de CFL para a manipulação das culturas; **E)** presença de contaminação, após 7 dias de cultivo; **F)** Segmento nodal oxidado, após 7 dias em meio de cultura MS; **G)** Vista geral com oxidação e contaminação; **H)** Segmento nodal com início de indução, em meio de cultura WPM com carvão ativado. Barra: E-H = 1,0 cm. 19

Figura 3 - Porcentagem média de contaminação por fungos e bactérias, oxidação e indução de brotos, em resposta a introdução *in vitro* de três variedades* de oliveira (*Olea europaea* L.), após 2 semanas de cultivo em meio de cultura básico MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd, McCown, 1980). *ARS = Arbosana; ARQ = Arbequina e KOR = Koroneiki. 21

Figura 4 - Comprimento das brotações em segmentos nodais de oliveira cultivados em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP e ANA. (Fonte: DUTRA et al., 2003). 23

Figura 5 - Matéria fresca da parte aérea em segmentos nodais de oliveira cultivados em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP e ANA. (Fonte: DUTRA et al., 2003). 23

Figura 6 - Ensaio de estaquia das variedades Arbequina, Arbosana e Koroneiki (*Olea europaea* L.): **A)** Planta matriz utilizada como fonte de estacas. **B)** Substrato comercial. **C)** Textura do substrato comercial utilizado. **D)** Preparo da bandeja. **E)** Detalhe das estacas na bandeja. **F)** Indução de brotações após 20 dias. **G-J)** 30 dias após a instalação do ensaio: **G)** Com formação de calo; **H)** Indução de raízes; **I)** Estacas com necrose; **J)** Estacas oxidadas e com a formação de calo. Barra: G-H = 2,0cm; I-J = 5,0cm. 27

Figura 7 - Porcentagem de oxidação dos ensaios 1 e 2 em três variedades de (*Olea europaea* L.) em resposta ao processo de estaquia, após 30 dias da instalação do experimento. 28

Figura 8 - Formação de calo em ensaios 1 e 2 de três variedades de (*Olea europaea* L.) em resposta ao processo de estaquia, após 30 dias da instalação do experimento. 28

Figura 9 - Número médio dos valores obtidos em oito repetições, de estacas herbáceas e semilenhosas de oliveira que apresentaram formação de calos em sistema de enraizamento protegido e aquecimento basal. (Fonte: DONATTI, 2008). 30

Figura 10 - Percentual de estacas herbáceas e semilenhosas de oliveira com e sem formação de calos em ambiente protegido e aquecimento basal. (Fonte: DONATTI, 2008). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem (%) média de contaminação, oxidação e sobrevivência do cultivo *in vitro* de três variedades de oliveira (Arbequina, Arbosana e Koroneiki), em quatro ensaios testados, aos sete e quatorze dias após introdução *in vitro*.20

Tabela 2 - Média de contaminação bacteriana, contaminação fúngica, oxidação, sobrevivência, estabelecimento, número médio de brotações, comprimento de brotações e número de folhas/brotação de explantes de oliveira (*Olea europaea* L.) “Arbequina” em diferentes meios de cultura e concentrações de zeatina. (Fonte: DONINI et al., 2008).25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB – Ácido indol-butírico

ANA - Ácido naftalenoacético

BAP – 6-benzilaminopurina

CFL – Câmara de fluxo laminar

DKW - Meio Driver Kuniyuki for Walnut medium

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

HCl – Ácido clorídrico

MS – Formulação salina (Murashige e Skoog, 1962)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial de hidrogênio

ppm – Partes por milhão

TDZ – thidiazuron

WPM - Wood Plant Medium

μM – Micro Molar

GA3 – giberelina

2iP - dimetil-alil-amino-purina

SUMÁRIO

RESUMO	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Cultivo in vitro	14
2.1.1 Material vegetal e ambiente de cultivo	14
2.1.2 Ensaio de introdução in vitro	14
2.2 Ensaio de produção de mudas por estaquia	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 Planta Matriz	18
3.2 Desinfestação e introdução in vitro	19
3.3 Multiplicação in vitro de oliveira	22
3.4 Alongamento e enraizamento in vitro de oliveira	25
3.5 Propagação de oliveira por estaquia	25
4 CONCLUSÃO	33
ABSTRACT	34
REFERÊNCIAS	35

Desenvolvimento de técnicas de estabelecimento *in vitro* e enraizamento por estaquia de três variedades de oliveira (*Olea europaea* L.)

Gabriela Fossatti

RESUMO

A oliveira (*Olea europaea* L.) pertence à família Oleaceae, sendo cultivada pela sua produção de frutos para a extração do azeite de oliva e azeitonas de mesa, além de sua grande importância econômica, social e cultural. Tem ocorrência principalmente na bacia do mediterrâneo, sendo estendida para vários países do mundo. O Brasil é o segundo maior importador de azeite e o quarto maior importador de azeitonas de mesa. Dessa maneira, os acréscimos de pesquisas que promovam melhorias na produção e qualidade dos produtos tornam-se pertinentes. O presente trabalho teve como objetivo o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, através de diferentes processos de desinfestação e composição de meios de culturas e a indução do enraizamento de estacas jovens para a produção de mudas de três variedades de oliveira (Arbequina, Arbosana e Koroneiki). O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais testaram-se diferentes ensaios de desinfestação. Na introdução *in vitro* foram testados diferentes composições de meios de cultura, com base nas formulações salinas MS e WPM suplementadas com BAP (1 μ M) e o uso do antibiótico Estreptomax[®] (4 ml/L), para obter culturas assépticas, bem como a adição de ácido ascórbico (250 mg/L), ácido cítrico (150 mg/L) e carvão ativado (1,5 g/L), como agentes antioxidantes. No ensaio de indução do enraizamento utilizaram-se estacas de ramos jovens a partir de plantas matrizes das três variedades mantidas em casa de vegetação. Testaram-se diferentes concentrações de AIB (1000; 2000; 4000 ppm), dispostas em bandejas contendo substrato comercial Carolina II[®] de textura leve, mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura e sob irrigação intermitente. Nas avaliações das culturas *in vitro*, notou-se uma contaminação persistente dos explantes e elevada oxidação, o que sugere que a planta tenha associação com contaminantes endógenos e possua recalcitrância *in vitro*, impedindo os subcultivos e respostas morfogênicas. A desinfestação apresentou melhor resultado quando foi adicionado o antibiótico Estreptomax[®] e a oxidação foi controlada com o uso de ácido ascórbico e ácido cítrico, na manipulação das culturas e adição de carvão ativado no meio de cultura. O uso dos sais de WPM proporcionou uma redução da oxidação fenólica nos tecidos de oliveira inoculados, quando comparado ao meio MS. No estabelecimento por estaquia observou-se que o uso de 1000 ppm de AIB, promoveu a indução do sistema radicular em apenas uma estaca e elevada oxidação nas demais, já para maiores concentrações de 4000 ppm de AIB, houve maiores formações de calo, porém não induziu ao enraizamento. O presente trabalho serviu como base inicial para a identificação de técnicas de cultivo para aperfeiçoar, reduzir custos e para pesquisas posteriores estimularem o cultivo de oliveira no Brasil, com variedades de alta produtividade para extração do óleo e dos frutos com qualidade.

Palavras chave: Cultura de tecidos. Desinfestação. Micropropagação. Produção de mudas.

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.), pertence à família Oleaceae, é cultivada mundialmente por apresentar a produção de frutos com dupla finalidade, a extração do azeite de oliva ou azeitonas de mesa. É tradicionalmente usada desde os tempos remotos pela humanidade, principalmente na culinária e uso medicinal (DUTRA et al., 2004).

O cultivo da oliveira tem seu desenvolvimento principalmente na bacia do Mediterrâneo, com área de distribuição estendida para outros países do mundo como China, Austrália e diversos países da América do Sul (PINHEIRO et al., 2013).

No Brasil, o cultivo iniciou-se há alguns séculos, sendo transportada por imigrantes europeus, porém, a espécie se manteve em cultivos restritos no país. Pela atividade ser considerada nova, é difícil encontrar estatísticas disponíveis, contudo, os cultivos recentes demonstram que algumas variedades utilizadas são adaptadas ao solo e clima brasileiros (DONINI et al., 2008).

Brasil é o segundo maior importador mundial de azeite de oliva e o quarto maior importador mundial de azeitonas de mesa. Porém, a área de plantio e de produção é considerada insignificante, por não possuir plantio comercial fica praticamente dependente da importação de seus derivados. O Chile e a Argentina destacam-se por serem os maiores produtores e exportadores de azeitonas e azeites (SILVA et al., 2012).

Restringindo-se ao estado de Santa Catarina, o trabalho com oliveiras teve início em 2005. Em, 2008 iniciou a implantação de unidades de pesquisa, pela EPAGRI e, dois anos e quatro meses após o plantio, em algumas unidades em várias cidades, proporcionaram a primeira colheita de azeitonas. A partir destes frutos, foi produzido o primeiro óleo de oliva extra virgem no estado (CROCE, 2009).

Dados do cultivo das variedades Arbosana, Arbequina e Koroneiki em Caçador, Campo Erê, Chapecó e São Lourenço do Oeste, revelaram que tem alto potencial de adaptação e produtividade em Santa Catarina. A variedade Arbequina apresenta azeite de caráter frutado e fresco, com atributos equilibrados, sabores verdes e picantes quando colhidas verdes, e mais doces quando mais maduras. A variedade Arbosana possui alta resistência ao frio, sendo precoce e apresenta azeite com mistura complexa de frutados, sendo picante e amargo. E a variedade Koroneiki é principalmente encontrada em regiões onde o clima é mais ameno, no ano de 2010 a maior produção foi obtida com esta variedade em Caçador, seu óleo é frutado, picante com leve amargor (CROCE et al., 2015).

A oliveira tem grande valor econômico, social e cultural. Técnicas de cultivo *in vitro* têm proporcionado à produção de propágulos e mudas de maior qualidade genética e fitossanitária. Além disto, esta técnica auxilia no desenvolvimento de novas cultivares e na conservação de germoplasma, importante ferramenta para o melhoramento vegetal. Contudo, a oliveira é uma espécie lenhosa e apresenta recalcitrância *in vitro*, fazendo com que a aplicação do cultivo se torne um desafio (ANDRADE, 2002).

Em relação à oliveira cultivada *in vitro*, por ser uma espécie lenhosa, libera exsudatos derivados da oxidação de compostos fenólicos, sendo necessária a aplicação no meio de cultura de antioxidantes como, por exemplo, o carvão ativado. Para este tipo de enraizamento são utilizadas brotações vigorosas, cultivadas em meio com baixas concentrações de sais minerais, açúcares e auxinas, em substituição às citocininas. Para o cultivo *in vitro* de oliveira, as seguintes fases são estabelecidas: coleta de material, cultivo dos explantes, multiplicação, enraizamento e aclimatização (RIBEIRO et al., 2009).

A multiplicação em nível comercial ocorre por propagação vegetativa, em especial por estaquia e enxertia. A propagação por sementes não é aconselhável em função da variabilidade genética e longo período juvenil, além da baixa germinação em condições de campo, outra alternativa é a propagação por meio de estacas lenhosas, atualmente é o método mais empregado. O enraizamento de estacas e a enxertia, embora sejam as práticas mais adotadas para produção de mudas dessa espécie, apresentam como desvantagem a reduzida eficiência, sendo influenciadas pelas variações sazonais do clima, pela constituição genética das variedades e por questões nutricionais e sanitárias do material vegetal utilizado (PIO et al., 2005).

A estaquia na oliveira é um método de propagação muito utilizado, sendo sua viabilidade dependente da capacidade de formação de raízes, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada por esse método na área de produção (FACHINELLO et al., 1995).

Os fatores que afetam o enraizamento podem ser classificados em: fatores internos ou endógenos, como as condições fisiológicas e idade da planta-matriz, época de coleta da estaca, potencial genético de enraizamento, sanidade, balanço hormonal, oxidação de compostos fenólicos e posição da estaca no ramo, e fatores externos ou exógenos, como a temperatura, luz, umidade e substrato. Os principais problemas estão relacionados aos fatores endógenos, tornando-se importante o uso de reguladores de crescimento, a fim de proporcionar melhoria do enraizamento. O grupo de reguladores de crescimento utilizados com maior frequência na indução de enraizamento é o das auxinas. É necessário que haja um balanço hormonal entre promotores e inibidores do processo de iniciação radicular (RIBEIRO et al., 2009).

Atualmente, a oliveira é propagada através do enraizamento de estacas semilenhosas sob nebulização, o que permite produzir mudas de melhor qualidade e em quantidade suficiente para atender à demanda da moderna olivicultura. O êxito obtido com este método de propagação é atribuído ao menor espaço empregado e a melhor qualidade e rapidez com que se obtêm as plantas em relação aos outros métodos, o que permite baixar os custos de produção (FACHINELLO et al., 1995).

O uso das estratégias de cultivo *in vitro* e estaquia de oliveira permitirá a redução no tempo do processo de produção das mudas, com qualidade fitossanitária e em larga escala, permitindo com isto um aumento na área de cultivo no Brasil, e conseqüentemente, redução na importação do óleo e de azeitona em conserva. Com isso, objetivo do presente trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, através de diferentes processos de desinfestação e composição de meios de culturas e a indução do enraizamento de estacas jovens para a produção de mudas de três variedades de oliveira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo *in vitro*

2.1.1 Material vegetal e ambiente de cultivo

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Genética, na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos, localizada a uma latitude de 27°16'58" sul e uma longitude de 50°35'04" oeste, estando a uma altitude de 1100 metros. Segundo Köppen a classificação do clima é Cfb, com temperatura média anual de 15.0 °C e pluviosidade média anual de 1676 mm.

As plantas matrizes das três variedades de oliveira (Arbosana, Arbequina e Koroneiki) foram adquiridas de doação através do pesquisador Eduardo Brugnara, responsável pelo projeto de oliveiras no CEPAF - Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar da Epagri, Estação Experimental da EPAGRI de Chapecó, SC. Em seguida estas mudas foram transplantadas para vasos nº 5 de 8,5 L de volume e conduzidas em casa de vegetação, sob controle de temperatura e umidade, para promover o desenvolvimento de brotações jovens. Estas brotações foram utilizadas como fontes de explantes para os ensaios de introdução *in vitro*.

2.1.2 Ensaios de introdução *in vitro*

Foram testados diferentes processos de desinfestação e meios de cultura a cada introdução, para obter melhores resultados quanto à taxa de contaminação e oxidação para o desenvolvimento das culturas.

Em todos os ensaios o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH e HCl a 0,5N e os meios transferidos para tubos de ensaio (22 x 150mm), hermeticamente fechados com papel alumínio e plástico filme, submetidos a autoclavagem em 121 °C, 1,3 atm., por 20 minutos.

Ensaio 1 - Segmentos nodais, excisado de brotações jovens das plantas matrizes, com 2,0 cm de comprimento foram imersos em água destilada e transportados para o laboratório. Em laboratório foram lavados com água destilada e adicionados de duas a três gotas de Tween 20. Em câmara de fluxo laminar (CFL) foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: 1) Imersão em álcool 70% por cerca de 30 segundos; 2) Imersão em NaOCl - hipoclorito de sódio comercial a 40% ($\pm 1\%$ de cloro ativo), sob agitação constante por 15 minutos; 3) Três enxagues em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação e em CFL os segmentos nodais foram excisados as extremidades de pecíolos e dos internos, permanecendo aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Em seguida

foram inoculados em tubos de ensaios (25x150 mm) contendo 10 ml do meio de cultura com formulação salina MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de vitaminas de Morel (2 mL/L), sacarose (30 g/L) e ágar (7,5 g/L). Para cada variedade foram inoculados 10 segmentos de nó e um explante por tubo. As culturas foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por um período de sete dias, visando à diminuição da oxidação. Após este período o material foi transferido para luz com fotoperíodo de 16 horas. Avaliações de sobrevivência, oxidação e contaminação foram realizadas após sete e quatorze dias de cultivo.

Ensaio 2 – Com base no resultado do ensaio 1, foram testados novos procedimentos de desinfestação e composição do meio de cultura. Segmentos nodais, já descritos no ensaio 1 foram excisados das plantas matrizes e imersos em solução de ácido ascórbico (250 mg/L), ácido cítrico (150 mg/L) para transportar ao laboratório. Em laboratório foram lavados com água destilada e adicionados de duas a três gotas de Tween 20. Em câmara de fluxo laminar (CFL) foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: 1) Imersão em álcool 70% por cerca de um minuto; 2) NaOCl comercial a 40% por 20 minutos; 3) Três enxagues em água destilada e autoclavada, todos sob agitação constante.

Em CFL os segmentos de nó foram preparados de acordo com a descrição do ensaio 1. Os 10 segmentos de nó, utilizados como explantes foram inoculados em tubos de ensaio, um explante por tubo, este contendo o meio de cultura básico MS, de acordo com o ensaio 1, porém, adicionado (4 mL/L) de antibiótico Estreptomax[®] (Estreptomicina), este sendo um antibiótico bactericida, com atividade principal contra bactérias Gram-negativas e atividade variável contra bactérias Gram-positivas, também ácido ascórbico (150 mg/L) e ácido cítrico (250 mg/L) como agentes antioxidantes, suplementado com 1 μM de BAP como fitorregulador, para promover proliferação múltipla das brotações.

As culturas foram mantidas em mesmo ambiente descrito no ensaio 1. Avaliações de sobrevivência, oxidação e contaminação foram realizadas em sete e quatorze dias após a inoculação.

Ensaio 3 - Com base nos resultados do ensaio 2, foi realizado novo ensaio, utilizando o mesmo procedimento de desinfestação, porém, foi testado a formulação salina WPM (Lloyd, McCown, 1980), como meio de cultura básico, suplementado com (1 μM) de BAP e adicionado de vitaminas de Morel (2 mL/L), sacarose (30 g/L), ágar (7,5 g/L), ácido ascórbico (250 mg/L), ácido cítrico (150 mg/L) e o antibiótico Estreptomax (4 mL/L). Para cada variedade foram inoculados 10 segmentos de nó e um explante por tubo.

Ensaio 4 – Neste buscou-se reduzir a oxidação, com o uso de carvão ativado. Ao meio básico WPM, foi suplementado com BAP (1 μM), acrescentado de vitaminas de Morel (2 mL/L),

sacarose (30 g/L), ácido ascórbico (250 mg/L), ácido cítrico (150 mg/L), antibiótico Estreptomax (4 ml/L), ágar (7,5 g/L) e carvão ativado (1,5 g/L). Para cada variedade foram inoculados 10 segmentos de nó e um explante por tubo.

2.2 Ensaios de produção de mudas por estaquia

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, localizada a uma latitude de 27°16'58" sul e uma longitude de 50°35'04" oeste, estando a uma altitude de 1100 metros.

Estacas lenhosas e semilenhosas com 10-12 cm de comprimento, extraídas da região mediana dos ramos jovens das plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, foram utilizadas para a produção de mudas de três variedades de oliveira.

Ensaio 1 - O delineamento experimental utilizado foi um bifatorial (3x2), com seis tratamentos: Três variedades (Arbosana, Arbequina e Koroneiki) combinadas com duas concentrações de AIB (ácido indol-butírico) (1000 e 2000 ppm). Cada unidade experimental foi constituída de 6 estacas, com três repetições disposta completamente ao acaso, de acordo com o croqui (Fig. 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6	R31	R22	R23	R25	R15	R13	R23	R11	R14	R33	R24	R21
5	R15	R24	R21	R22	R34	R14	R22	R15	R12	R34	R22	R25
4	R13	R21	R11	R31	R33	R23	R34	R13	R11	R31	R14	R34
3	R14	R23	R35	R32	R15	R24	R35	R12	R22	R35	R13	R33
2	R11	R25	R34	R35	R13	R32	R33	R14	R23	R32	R15	R32
1	R12	R32	R33	R12	R14	R21	R12	R24	R25	R12	R11	R24
	1.000	1.000	2.000	2.000	1.000	1.000	2.000	2.000	1.000	1.000	2.000	2.000
	ARBOSANA				ARBEQUINA				KORONEIKI			

Figura 1 - Croqui de distribuição das repetições e tratamentos no enraizamento por estaquia das variedades: Arbosana, Arbequina e Koroneiki referente ao ensaio 1. (UFSC, Campus de Curitibanos, 2017).

Na preparação das estacas foi efetuado o corte em bisel na basal de cada estaca e mantidas duas folhas apicais, com a metade do limbo foliar, pois algumas espécies regeneram-se melhor se a estaca foliar contiver um gomo axilar. A base das estacas foi imersa durante 10 segundos em contato com a solução de AIB. O substrato comercial utilizado foi Carolina II[®] que tem na sua composição, vermiculita, palha de arroz, perlita, esfagno e carvão vegetal, conferindo uma consistência que proporciona aeração eficiente para a formação dos primórdios radiculares.

O substrato foi distribuído em bandeja de 72 células, levemente umedecido e as estacas plantadas a uma profundidade média de 4 a 6 cm.

Ensaio 2 - O delineamento experimental e croqui seguiram com base no ensaio 1, porém, variou as concentrações de AIB para (2000 e 4000 ppm). Cada unidade experimental foi constituída de 6 estacas, com três repetições disposta completamente ao acaso.

Neste ensaio utilizou-se as mesmas condições de bandeja e substrato, do ensaio 1. Após efetuado o corte em bisel na basal de cada estaca e mantidas duas folhas apicais, com a metade do limbo foliar, sua base foi imersa durante 10 segundos em contato com a solução AIB e plantadas a uma profundidade média de 4 a 6 cm.

Ambas as bandejas foram mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura e sob irrigação intermitente, com turnos de rega a cada 30 min. e dez regas por dia, para manutenção da umidade às estacas. Dados de % de oxidação, número de raízes e formação de calo foram avaliados após 30 dias em substrato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planta Matriz

Plantas matrizes das variedades Arbequina, Arbosana e Koroneiki, quando transplantadas de sacos plásticos para vasos de volume maior e conduzidas em casa de vegetação promoveram a proliferação de brotações jovens, após 30 dias de cultivo em vasos (Fig. 3A-C). Conforme a indicação para obtenção desses resultados são observadas nas mudas acondicionadas em ambiente protegido, casa de vegetação, que este critério proporciona o sucesso no estabelecimento do cultivo *in vitro* tendo sua origem com a preparação da planta matriz, que deve ser de elevada qualidade sanitária e genética (Grattapaglia; Machado, 1998).

Porém, a partir de três meses mantidas em casa de vegetação, observou-se o aparecimento de folhas com desenvolvimento de fungos, além de infestação de mosca branca. Contudo, nenhum produto foi aplicado, o controle foi realizado retirando todas as plantas da casa de vegetação, lavando-as com água corrente folha a folha pra tentar reduzir a contaminação por fungo. Isso pode ter ocorrido devido á disseminação da doença iniciada em outra planta presente no mesmo local.

Consequentemente, para a oliveira, uma espécie lenhosa, cuja propagação vegetativa por métodos convencionais é ineficiente e limitada pela influência sazonal do clima, a micropropagação poderia assumir uma posição de destaque na multiplicação dessa espécie. No Brasil, o cultivo comercial da oliveira só está começando, mas já se percebe que a disponibilidade de mudas de qualidade é uma limitante para sua expansão no território nacional (SOUZA et al., 2006).

Além de manter as plantas matrizes de oliveira em ambiente protegido em casa de vegetação sem contato com o ambiente externo, outra medida em caráter experimental adotada pelos pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da EPAMIG Sul de Minas, com o intuito de reduzir as taxas de contaminação tanto por bactérias como por fungos, seriam aplicações intercaladas e contínuas do fungicida sistêmico Amistar® (Azoxystrobin) e do fungicida de contato Orthocide® (Captan) associado com o antibiótico Agrimicina® (Streptomomicina + terramicina).

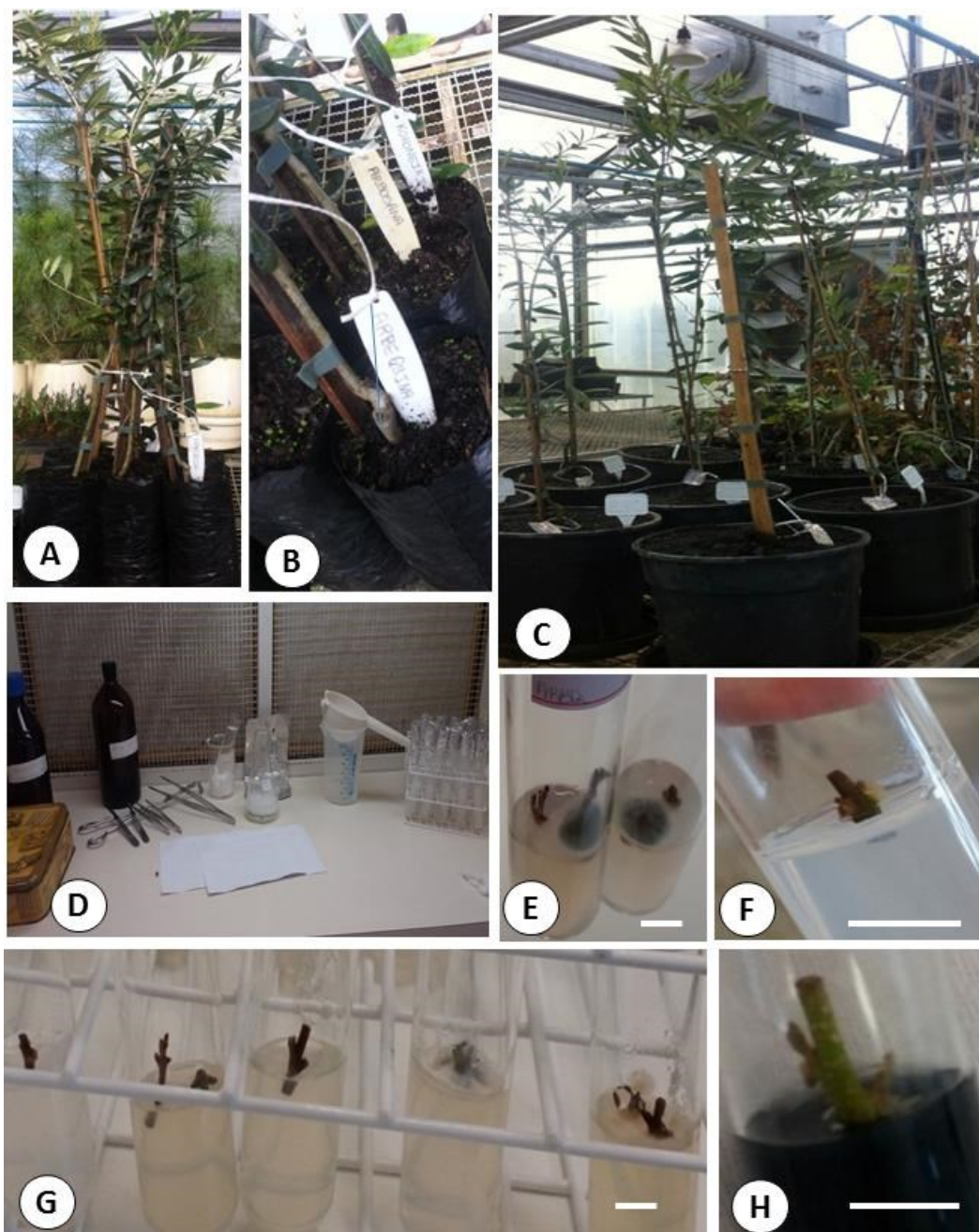


Figura 2 - Estratégias de estabelecimento *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **A)** Mudas jovens de oliveira recebidas do CEPAF/EPAGRI, Chapecó (SC) e mantidas em casa de vegetação; **B)** Detalhe da identificação das três variedades: Arbequina, Arbosana e Koroneiki. **C)** Transplante das mudas para vasos maiores com identificação individual; **D)** Ambiente de CFL para a manipulação das culturas; **E)** presença de contaminação, após 7 dias de cultivo; **F)** Segmento nodal oxidado, após 7 dias em meio de cultura MS; **G)** Vista geral com oxidação e contaminação; **H)** Segmento nodal com início de indução, em meio de cultura WPM com carvão ativado. Barra: E-H = 1,0 cm.

3.2 Desinfestação e introdução *in vitro*

No primeiro ensaio, a desinfestação com álcool (70%) por 30 seg e água sanitária comercial (40%) por 15 min., resultou em 100% de contaminação e, principalmente, com 100%

de oxidação, observado pelo escurecimento dos segmentos nodais e não ocorreu nenhuma indução de brotos, em 14 dias de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem (%) média de contaminação, oxidação e sobrevivência do cultivo *in vitro* de três variedades de oliveira (Arbequina, Arbosana e Koroneiki), em quatro ensaios testados, aos sete e quatorze dias após introdução *in vitro*.

Tratamento de Desinfestação*	Contaminação (%)		Oxidação (%)		Sobrevivência (%)	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Ensaio 1	70%	100 %	80%	100%	10%	0%
Ensaio 2	50%	80%	70%	95%	20%	10%
Ensaio 3	60%	75%	75%	80%	35%	10%
Ensaio 4	30%	50%	30%	60%	60%	15%

* Ensaio 1: Alcool 70% por 30 seg.; NaOCl comercial (40%) por 15 minutos; Três enxagues em água autoclavada; meio de cultura e sais do MS.

Ensaio 2: Alcool 70% por 1 min.; NaOCl comercial (40%) por 20 minutos; Três enxagues em água autoclavada; meio de cultura MS, acrescidos de ácido cítrico, ácido ascórbico e antibiótico.

Ensaio 3: Alcool 70% por 1 min.; NaOCl comercial (40%) por 20 minutos; Três enxagues em água autoclavada; meio de cultura WPM, acrescidos de ácido cítrico, ácido ascórbico e antibiótico.

Ensaio 4: Alcool 70% por 1 min.; NaOCl comercial (40%) por 20 minutos; Três enxagues em água autoclavada; meio de cultura WPM, acrescidos de ácido cítrico, ácido ascórbico, antibiótico e carvão ativado.

A partir do segundo ensaio, com o uso da solução de ácido ascórbico mais ácido cítrico, desde a coleta dos explantes e concomitantemente com a manipulação dos mesmos em CFL com as luzes apagadas (Fig. 3D), observou-se uma redução gradativa das oxidações (Fig. 3E; Tabela 2), porém, ainda com a proliferação de fungos (Fig. 3E).

O melhor resultado foi quando se trabalhou com as luzes apagadas, uma vez que notou-se menos oxidação inicial, porém a porcentagem de fungos e bactérias permaneceu inalterada (Fig. 3F). A maior contaminação pode ter ocorrido por ainda não ter se estabelecido um protocolo de desinfestação de oliveira para estas cultivares. Segundo Donini (2009), para diminuir a contaminação *in vitro* (Fig. 3G), as mudas deveriam ser pulverizadas a cada dois dias, por no mínimo três aplicações, com o antibiótico Agrimicina (Streptomycin) e fungicida Cercobin nas doses de 2,4 g/L e 0,7 g/L, respectivamente. No terceiro ensaio, houve maior sucesso no uso do meio de cultura WPM. No período de introdução houve muita oxidação e contaminação, dificultando e impossibilitando o subcultivo para a multiplicação e obtenção do estabelecimento asséptico da cultura. Tal permanência sugere que entre os principais problemas já identificados, está a oxidação por compostos fenólicos exsudados pela própria planta, elevada taxa de

contaminação por microrganismos endosimbiontes e recalcitrância intrínseca da oliveira para o enraizamento *in vitro* (BARRUETO CID; ZIMMERMANN, 2006).

No quarto ensaio, após elevada taxa de contaminação e oxidação, foram utilizados tubos de ensaio com meio de cultura WPM com carvão ativado (Fig. 3H), medidas como a adição de ácido ascórbico e ácido cítrico que são poderosos agentes antioxidantes, e carvão ativado na composição do meio (Fig. 4). Já para o controle das bactérias presentes em ambos os meios, este foi minimizado pela adição de antibiótico.

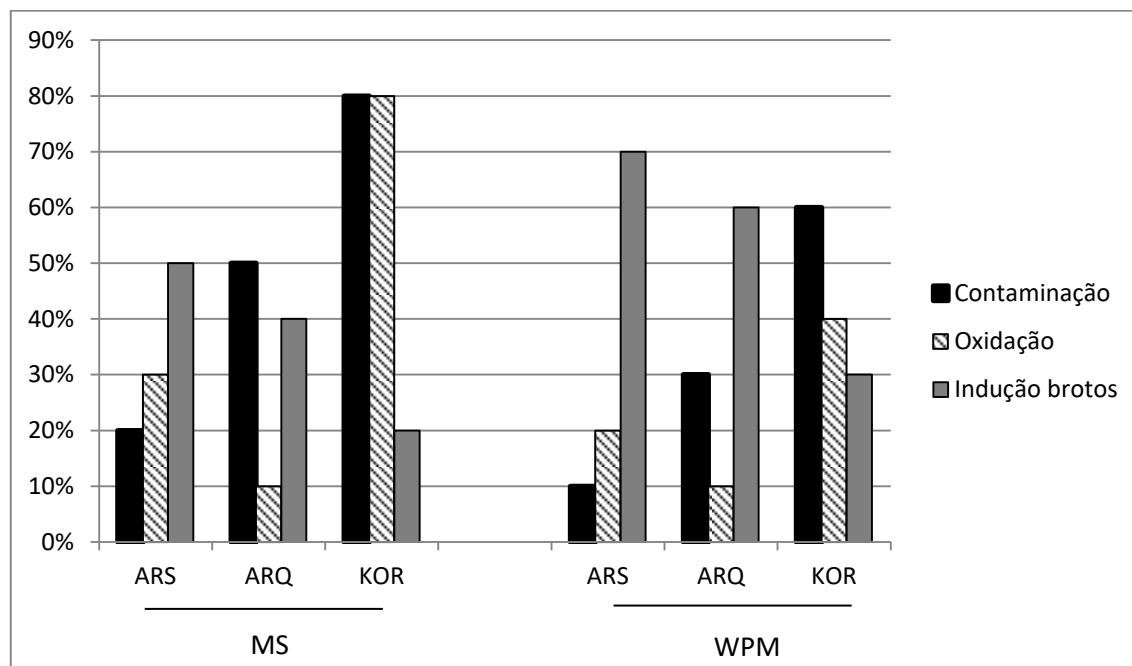


Figura 3 - Porcentagem média de contaminação por fungos e bactérias, oxidação e indução de brotos, em resposta a introdução *in vitro* de três variedades* de oliveira (*Olea europaea* L.), após 2 semanas de cultivo em meio de cultura básico MS (Murashige e Skoog, 1962) e WPM (Lloyd, McCown, 1980). *ARS = Arbosana; ARQ = Arbequina e KOR = Koroneiki.

Após sucessivas introduções *in vitro*, quando se obteve a taxa mínima de contaminação e oxidação apresentada pelo meio WPM (Tabela 1), durante a introdução ainda foi possível observar diferenças significativas entre as médias relacionadas ao número de brotos por tratamento, onde a maior taxa de multiplicação foi observada quando se utilizou como meio de cultura a formulação salina WPM suplementada de 1 μ M de BAP e carvão ativado, quando comparada ao meio MS. A citocinina BAP tem sido considerada efetiva na multiplicação de brotações *in vitro* (SOARES, et al., 2011).

Além disso, brotos regenerados em meio contendo a formulação salina WPM mostraram-se mais vigorosos e com menor incidência de oxidação, sugerindo que a menor concentração de sais da formulação é benéfica para o cultivo da oliveira.

A multiplicação da variedade de oliveira Koroneiki, avaliaram o efeito de diferentes citocininas – dimetil-alil-amino-purina (2iP); 6 - benzilaminopurina (BAP); thidiazuron (TDZ) e Zeatina – em concentrações variáveis (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L) no meio Driver Kuniyuki for Walnut medium (DKW) descrito por Roussos et al. (1999). Esses autores observaram que as melhores respostas foram obtidas para a zeatina, principalmente quando utilizada na concentração de 2 mg/L (ROUSSOS; PONTIKIS, 2002). Embora esse resultado possa ser o mais adequado para cultivar descrita, não necessariamente indicam que a zeatina possa ser a melhor fonte de citocinina para outras variedades de oliveira. Dessa forma, para cada condição e genótipo, testes específicos devem ser conduzidos com o intuito de otimizar a micropropagação. Além disso, embora a zeatina apresente os melhores resultados para a fase de multiplicação nos trabalhos descritos, seu uso rotineiro em processos comerciais de micropropagação é inviável pelo elevado custo (ROUSSOS; PONTIKIS, 2002).

3.3 Multiplicação *in vitro* de oliveira

A partir da falta de obtenção de explantes viáveis das três variedades de oliveira utilizadas no presente trabalho, optou-se por uma revisão de literatura para a etapa de multiplicação das cultura *in vitro*. Entre estes, o trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras (MG). Este objetivou avaliar o efeito de concentrações de BAP e ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações laterais em microestacas de oliveira. Segmentos nodais de 2 cm, sem folhas, foram excisados de plântulas e inoculados assepticamente em meio MS, suplementado com sacarose (30 g/L), carvão ativado (2 g/L) e ágar (6 g/L), ajustado pH para 5,8 antes da autoclavagem. Sendo testadas as combinações dos reguladores BAP (0, 1, 2 e 4 mg/L) e ANA (0; 0,01; 0,1 e 1 mg/L) (DUTRA et al., 2004).

Os explantes inoculados permaneceram em sala de crescimento com intensidade luminosa e fotoperíodo. Entretanto, não houve efeito nos reguladores de crescimento no número de brotos, observando-se somente a alteração no crescimento em altura do único broto desenvolvido, indicando a dificuldade em se induzir brotações em oliveira. Maior comprimento de brotos foi obtido com 0,1 mg/L de ANA na ausência de BAP (Fig. 5). À medida que se aumentou a concentração de BAP, houve redução nessa variável, provavelmente em função de desbalanço hormonal. Maior matéria fresca da parte aérea foi obtida na ausência de BAP (Fig. 6), com subsequente redução à medida que se aumentou a concentração desse regulador de

crescimento. Essa resposta provavelmente é devida a um desbalanço na relação auxina/citocinina (DUTRA et al., 2004).

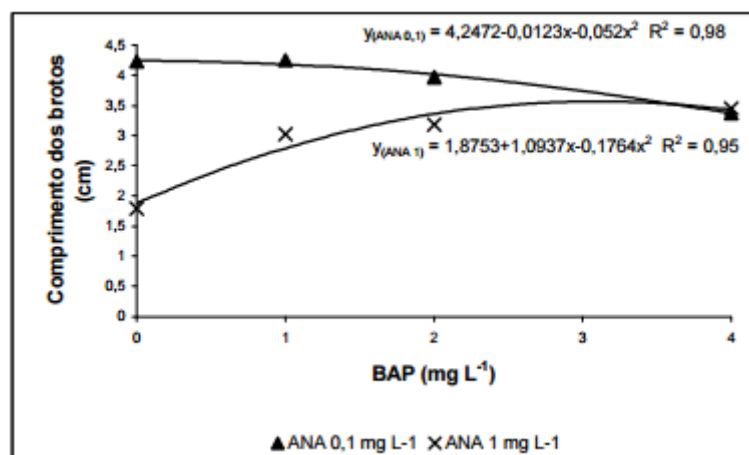


Figura 4 - Comprimento das brotações em segmentos nodais de oliveira cultivados em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP e ANA. (Fonte: DUTRA et al., 2003).

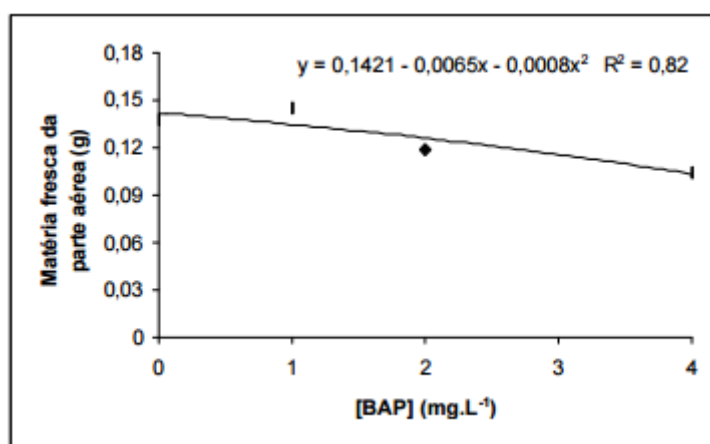


Figura 5 - Matéria fresca da parte aérea em segmentos nodais de oliveira cultivados em meio de cultura MS sob diferentes concentrações de BAP e ANA. (Fonte: DUTRA et al., 2003).

A ausência de resposta dos reguladores de crescimento na indução de brotações corrobora resultados anteriores obtidos com cultivo *in vitro* de oliveira (STANDARDI et al., 1998), verificando-se somente o crescimento em altura da brotação. Em vista disso, é necessário o estudo de alternativas, no intuito de induzir a proliferação de maior número de brotações. Como o BAP não foi efetivo nas concentrações utilizadas para multiplicação sugere-se a possibilidade da utilização de concentrações maiores. Outra possibilidade é o emprego de outras citocininas, a exemplo de zeatina, 2iP (2- isopentenil adenina) e TDZ (Thidiazuron), preferencialmente as duas últimas, em razão do elevado custo da zeatina.

Outro trabalho realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, da Universidade Federal de Pelotas (RS), foram utilizados segmentos nodais de plantas de oliveira “Arbequina”, mantidas em casa de vegetação. Visando diminuir a contaminação *in vitro*, as mudas foram pulverizadas com o antibiótico Agrimicina (Estreptomicina) e o fungicida Cercobin, nas doses de (2,4 e 0,7 g/L), respectivamente.

Os meios de cultura utilizados foram constituídos pelos sais e pelas vitaminas do MO (RUGGINI, 1984), pelos sais e pelas vitaminas do MS e pelos sais e pelas vitaminas do WPM, adicionados de diferentes concentrações de zeatina (0; 2; 4 mg/L). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro, por um período de sete dias, visando à diminuição de oxidação. Depois desse período, o material foi transferido para luz (DONINI et al., 2008).

Os explantes cultivados em meio MS apresentaram maior porcentagem de contaminação fúngica (92,95%) (Tabela 2). Para sobrevivência, estabelecimento e número de brotações, os explantes cultivados em meio WPM apresentaram as maiores médias, não diferindo de quando cultivados no meio MO (Tabela 2). A baixa taxa de sobrevivência e de estabelecimento também se deve pela alta porcentagem de contaminação e não em relação aos meios de cultura utilizados. Também foi observado que todos os explantes sobreviventes estavam estabelecidos, sendo que isso nem sempre pode ser um indicativo, pois a sobrevivência nem sempre indicará estabelecimento (ERIG & SCHUCH, 2003).

Então, as maiores médias de sobrevivência e estabelecimento foram obtidas quando se utilizou o meio WPM, independente da utilização do fitorregulador, pois só houve diferença para o fator meio de cultura.

Já em experimento de estabelecimento de oliveira, “Koroneiki”, Roussos; Pontikis (2002) utilizaram diferentes meios de cultura, incluindo MO, WPM, DKW, e observaram que os explantes apresentaram melhores respostas quando cultivados por um mês em meio DKW modificado. Em experimento seguinte, esses autores também observaram que adição de 1-2 mg/L de zeatina ou 0,1-0,2 mg/L de TDZ promoveram maior número de brotos. De acordo com ROUSSOS & PONTIKIS (2002), a zeatina é preferida pela oliveira, mas é uma citocinina extremamente cara e poderia ser substituída no meio de cultura por uma combinação de TDZ com giberelina.

Tabela 2 - Média de contaminação bacteriana, contaminação fúngica, oxidação, sobrevivência, estabelecimento, número médio de brotações, comprimento de brotações e número de folhas/brotação de explantes de oliveira (*Olea europaea* L.) “Arbequina” em diferentes meios de cultura e concentrações de zeatina. (Fonte: DONINI et al., 2008).

Avaliação	Variáveis	-----Meios-----			Média geral	Coeficiente de variação (%)
		MS	MO	WPM		
21 dias	Contaminação bacteriana (%)	2,37 a	1,33 a	0,32 a	1,47	424,26
	Contaminação fúngica (%)	92,95 a	75,71 b	67,56 b	51,95	37,05
	Oxidação (%)	1,33 a	0,59 a	0,00 a	1,47	424,26
	Sobrevivência (%)	3,68 b	15,25 ab	24,14 a	21,16	71,43
	Estabelecimento (%)	3,68 b	15,25 ab	24,14 a	21,16	71,43
45 dias	Número de brotações	0,15 b	0,36 ab	0,48 a	0,91	18,04
	Comprimento brotações (cm)	0,09 a	0,17 a	0,10 a	0,12	120,14
	Número de folhas/brotação	0,47 a	1,31 a	1,12 a	1,20	39,69

Médias não seguidas de mesma letra minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.4 Alongamento e enraizamento *in vitro* de oliveira

Nestes dois estádios também foi efetuado uma busca bibliográfica para o desenvolvimento do assunto. De acordo com Erig; Schuch (2003), as plantas lenhosas, em que é incluída a maioria das plantas frutíferas, apresentam dificuldades para o estabelecimento e alongamento *in vitro*, principalmente devido à contaminação e oxidação.

Há uma relação entre os níveis endógenos de auxinas e citocininas, responsáveis por disparar o processo de alongamento e rizogênese. Além disso, outras variáveis podem afetar o processo de formação de raízes adventícias em oliveira, tais como o excesso de osmolaridade do meio que ocasiona estresse hídrico, acúmulo de compostos fenólicos na base do segmento nodal que reduz a proliferação e diferenciação das células, baixa disponibilidade de substâncias de reserva no tecido, estado nutricional aquém do adequado, contaminação por patógenos, juvenilidade do material utilizado, espessura e lignificação da parede celular (GEORGE, 2008).

Todos esses fatores, atuando isoladamente ou em sinergia, podem inibir completamente o processo de rizogênese. No entanto, há pouca literatura disponível apontando as melhores condições para promover o enraizamento da oliveira *in vitro*.

3.5 Propagação de oliveira por estaquia

O uso de estacas herbáceas a semi-lenhosas, obtidas das plantas matrizes mantidas em casa de vegetação ou ambiente protegido (Fig. 7A), associado ao uso de substrato comercial (Fig. 7B), que apresenta textura leve (Fig. 7C) e disposta em bandeja de isopor (Fig. 7D, E), utilizados no presente trabalho, representam como componentes recomendados para produção de

mudas por estacas. De acordo com a literatura, um dos fatores mais importante para aumentar a taxa de enraizamento refere-se à composição do substrato. Este fator, quando observado a razão entre propriedades físicas (porosidade, textura, drenagem e baixa compactação) e químicas (presença de nutrientes e pH adequado ao desenvolvimento da muda) adequada a cada espécie resulta no sucesso da produção de mudas por estaquia (SANTOS, et al., 2013).

No primeiro ensaio, após 20 dias do início do ensaio, observou-se a indução de cerca de 60% das brotações nas estacas (Fig. 7F), este fator é resultante da existência de reservas interna a estaca que, pode comprometer a viabilidade e levar a morte caso não ocorra à indução de raízes. No entanto, em avaliações efetuadas após 30 dias observou-se a formação de calo (Fig. 7G) e uma estaca da variedade Koroneiki em 1000 ppm ocorreu à formação de raízes (Fig. 7H). Observou-se também que, um grande número de estacas apresentou a formação necrose na base das estacas e outras se apresentaram oxidadas, porém, com a formação de calo (Fig. 7I).

No segundo ensaio, após 30 dias de instalação, observaram-se resultados semelhantes ao primeiro ensaio, com indução de brotações em cerca de 80% das estacas e elevada formação de calo, principalmente com altas concentrações de AIB, porém, ocorreram oxidação e necrose da região basal (Fig. 7J) para a apical em grande número de estacas.

Embora, em ambos os ensaios foram utilizados substrato de alta porosidade, observou-se visivelmente o excesso de água no substrato, proporcionado pelo sistema de irrigação por microaspersão utilizado atualmente no Campus.

A avaliação deste experimento ocorreu 30 dias após a sua instalação, tempo menor que o ideal segundo Oliveira et al. (2006), sendo por este motivo realizada a observação não do enraizamento propriamente dito, mas da oxidação e presença de calos, que são diferenciações celulares conhecidas como estruturas indicadoras da formação dos primórdios de raízes adventícias. O surgimento de raízes em estacas de oliveira em ambiente protegido ocorre somente a partir de 60 dias após a instalação das mesmas, em câmaras de nebulização ou estufas, com aquecimento de substrato (OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006).



Figura 6 - Ensaio de estaquia das variedades Arbequina, Arbosana e Koroneiki (*Olea europaea* L.): **A)** Planta matriz utilizada como fonte de estacas. **B)** Substrato comercial. **C)** Textura do substrato comercial utilizado. **D)** Preparo da bandeja. **E)** Detalhe das estacas na bandeja. **F)** Indução de brotações após 20 dias. **G-J)** 30 dias após a instalação do ensaio: **G)** Com formação de calo; **H)** Indução de raízes; **I)** Estacas com necrose; **J)** Estacas oxidadas e com a formação de calo. Barra: G-H = 2,0cm; I-J = 5,0cm.

Comparando os ensaios, conforme mostra a Figura 8, houve alta taxa de oxidação para baixas concentrações de AIB (1000 ppm), conforme aumentou a concentração, diminuiu a oxidação. Para reduzir a porcentagem de oxidação, deve ser considerada a época correta de coleta das estacas e, principalmente, o uso da casa de vegetação com sistema de nebulização, quando comparado ao por microaspersão. Bem como, para oliveira é fundamental o uso de estufas que permitam o aquecimento do leito de substrato. Tais condições podem promover a formação de calo e indução do sistema radicular das estacas.

Na formação de calo (Fig. 9), observa-se que os resultados mais satisfatórios foram em doses de 4000 ppm de AIB, outros experimentos deveriam ser realizados com maiores concentrações a fim de ocorrer maiores formações de calo e talvez diminuir o período de tempo para consequentemente induzir o enraizamento dessas estacas.

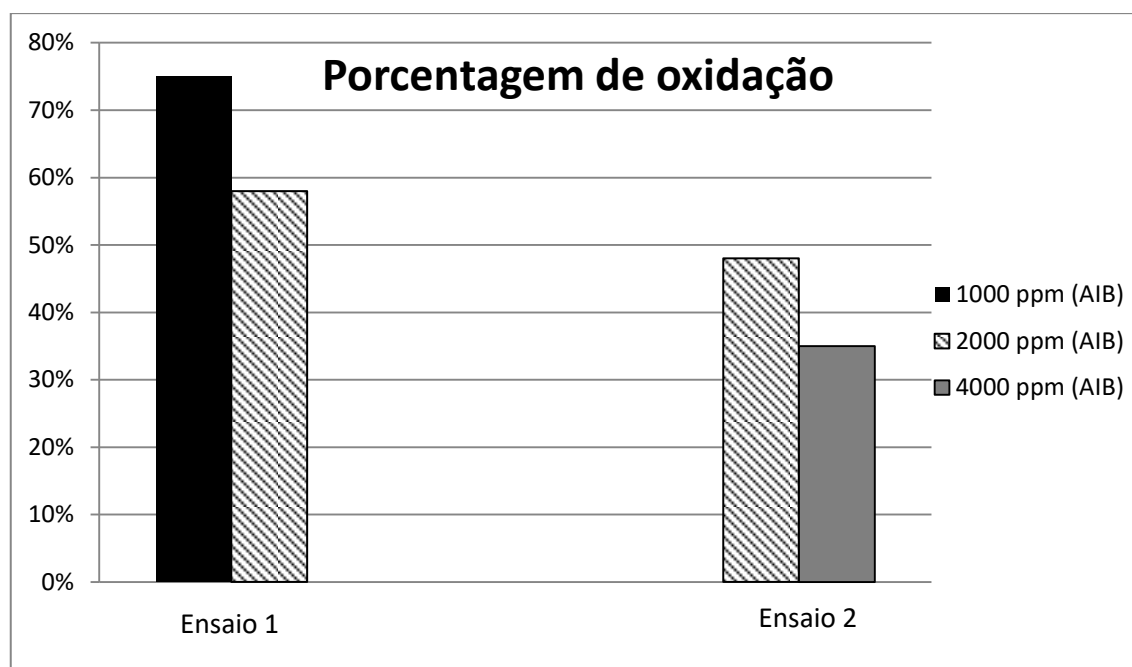


Figura 7 - Porcentagem de oxidação dos ensaios 1 e 2 em três variedades de (*Olea europaea* L.) em resposta ao processo de estaquia, após 30 dias da instalação do experimento.

Neste quesito esses resultados se devem ao fato da casa de vegetação não se encontrar em condições adequadas às quais são exigidas pela oliveira para seu desenvolvimento, uma vez que várias falhas ocorreram nesse período, como a interrupção de rega, descontrole da temperatura e umidade. Fatores como construção de uma pequena estufa dentro da casa de vegetação, sistema de circulação de água para aquecimento do substrato, uso de substrato adequado, época de coleta das estacas e uso de temporizador com intervalos adequados para nebulização ou rega são fundamentais para obtenção de melhores resultados.

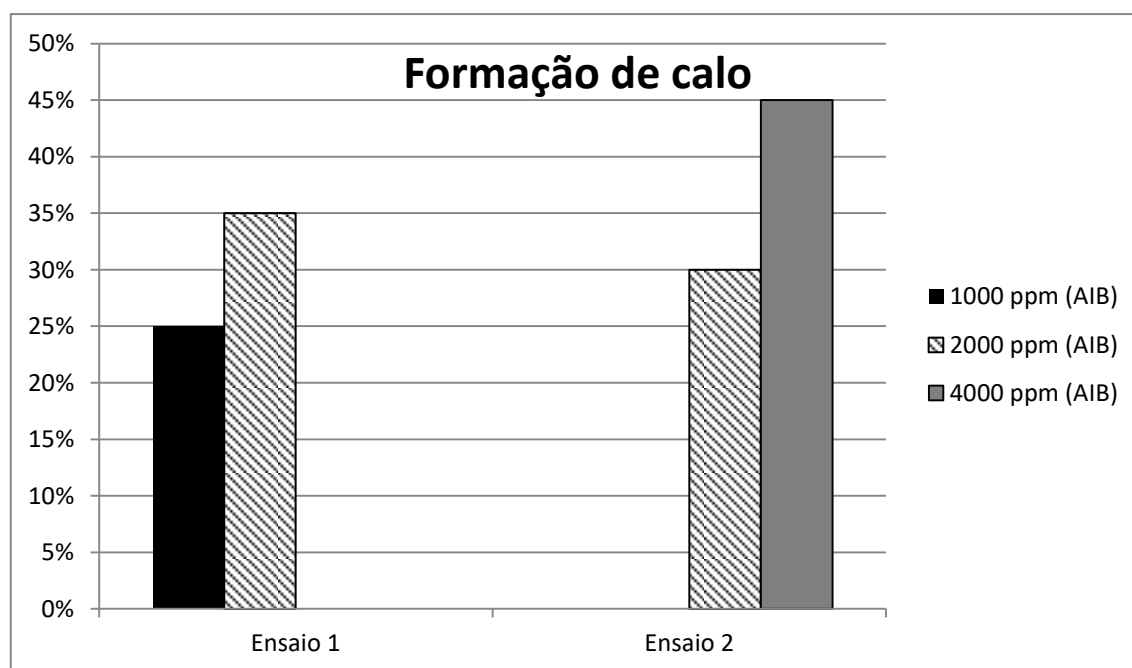


Figura 8 - Formação de calo em ensaios 1 e 2 de três variedades de (*Olea europaea* L.) em resposta ao processo de estaquia, após 30 dias da instalação do experimento.

Os processos tradicionais de enraizamento de estacas em leitos aquecidos e em ambiente protegido com atmosfera controlada possibilitam taxas de enraizamento de estacas que variam de 5% a 30%. Este, pode ser considerado medíocre em função dos elevados investimentos necessários para a formação e manutenção de áreas cultivadas com plantas matrizes e para a instalação e manutenção da infraestrutura necessária para a produção das mudas (PIO et al., 2005).

Podem-se classificar os fatores que afetam o enraizamento em fatores internos ou endógenos, considerando principalmente, as condições fisiológicas e idade da planta-matriz, época de coleta da estaca, potencial genético de enraizamento, sanidade, balanço hormonal, oxidação de compostos fenólicos e posição da estaca no ramo, também fatores externos ou exógenos, como a temperatura, luz, umidade e substrato (FACHINELLO et al., 1995).

Na Universidade de São Paulo – Piracicaba (SP), as estacas foram padronizadas com 12 cm de comprimento e mínimo de três pares de gemas. Os tratamentos constituíram-se de estacas com um par, dois pares e ausentes de folhas, submetidas em imersões de cinco segundos em quatro concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 3000 mg/L), sendo aprofundadas quatro centímetros da base da estaca na solução, após as estacas foram colocadas em bandejas, contendo o substrato comercial Plantmax®.

Tanto para estacas ausentes de folhas como para estacas com folhas, a concentração de 2000 mg/L promoveu os melhores resultados de enraizamento. A concentração de 3000 mg/L de AIB favoreceu o maior número de raízes e comprimento emitidos por estacas.

Estacas de oliveira dotadas de dois pares de folhas apresentaram 44,28% de enraizamento quando coletadas e postas para enraizar no mês de fevereiro e 16,64% de enraizamento no mês de abril, todas tratadas com 3000 mg/L de AIB. Entretanto, estacas do mesmo padrão, porém, sem receber tratamento com AIB, promoveram apenas 3,12% e 1,04% de enraizamento, respectivamente, coletadas nas duas épocas em questão (OLIVEIRA, 2001).

Por esses resultados, verifica-se a influência da época de coleta das estacas, o que deve ser mais estudado em oliveiras no Brasil. As melhores épocas para o enraizamento de estacas de oliveira são aquelas que coincidem com o final do fluxo de crescimento anual. No que se refere à época mais adequada na obtenção das estacas, há diferenças entre espécies, algumas enraízam melhor no início da primavera e outras desde a primavera até o início do outono (FACHINELLO et al., 1995).

Outro trabalho, segundo Donatti (2008), com o objetivo de avaliar o enraizamento de estacas semilenhosas e herbáceas de oliveiras em ambiente protegido e substrato aquecido,

permitindo o desenvolvimento de mudas aptas para plantio em escala comercial. Apresentou resultados conforme mostra Figura 10.

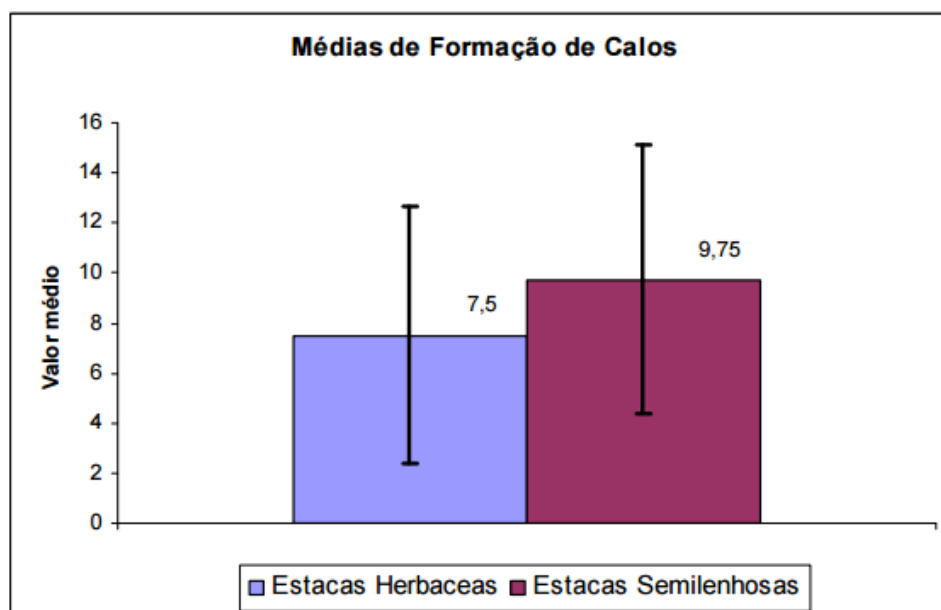


Figura 9 - Número médio dos valores obtidos em oito repetições, de estacas herbáceas e semilenhosas de oliveira que apresentaram formação de calos em sistema de enraizamento protegido e aquecimento basal. (Fonte: DONATTI, 2008).

Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade permite rejeitar a hipótese de que há diferenças na formação de calos e posterior enraizamento de estacas herbáceas e semilenhosas de oliveiras.

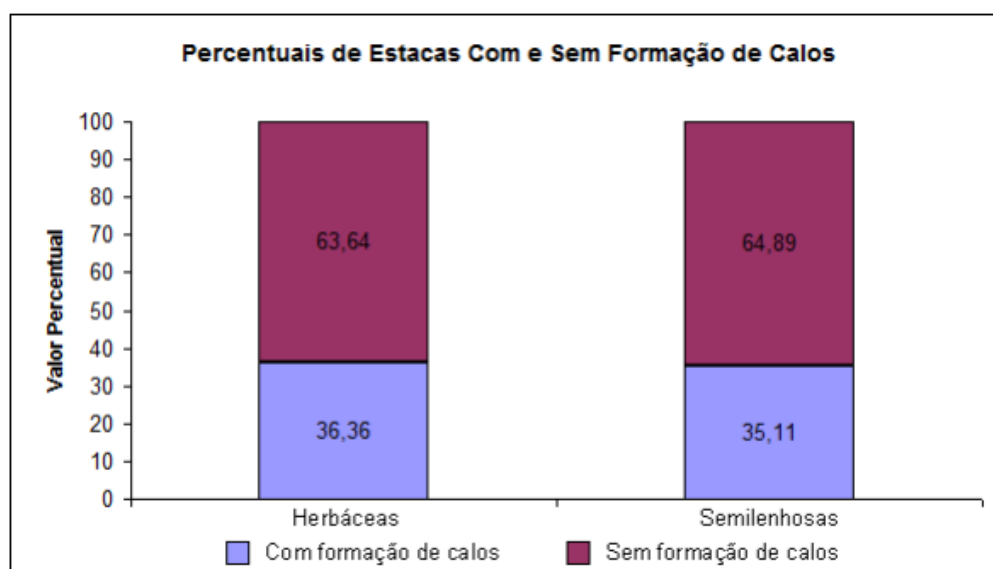


Figura 10 - Percentual de estacas herbáceas e semilenhosas de oliveira com e sem formação de calos em ambiente protegido e aquecimento basal. (Fonte: DONATTI, 2008).

Das estacas semilenhosas, apenas 79 (35,1%) apresentaram a formação de calos, enquanto para as de caráter herbáceo, apenas 60 (36,36%) apresentaram alguma calosidade (DONATTI, 2008).

A baixa umidade no substrato nos primeiros dias de implantação pode trazer elevado estresse para as estacas e até ocasionar morte. Além disto, a nebulização excessiva pode prejudicar a sobrevivência das estacas, concentrando muita umidade na base e ocasionando apodrecimento. Também o fato de não haver tratamento preventivo contra doenças fungicas nas estacas, pode atrapalhar a obtenção de melhores resultados (PIO et al., 2005).

Oliveira e colaboradores (2006), em experimento com enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira em câmara úmida com aquecimento de substrato, cujos índices de enraizamento variaram de 20 a 30%.

Perceberam que o excesso de nebulização em ambiente de mini-estufa aumenta a incidência de doenças fungicas e favorece o apodrecimento das estacas, em especial, aquelas de caráter mais lenhoso. Para reduzir o ataque de fungos, é importante efetuar um tratamento com solução de oxicloreto de cobre a 3%, como recomenda Oliveira et al. (2006), antes da instalação do experimento, reforçando-se a dose quando necessário.

A umidade relativa do ar no ambiente da estufa deve ser de 80 a 90%, não devendo ser exagerada, porém, elevada para que permita a manutenção da vida das estacas até que enraizem (PASQUAL et al., 2001).

As estacas de oliveira são muito sensíveis à perda de umidade, fator que causa elevado stress na multiplicação por estaquia e só se observa algumas semanas após a preparação do material, podendo ser verificada por sintomas como a perda das folhas e a morte das estacas da região basal para a apical. Desta forma, exige-se para a multiplicação de oliveiras por estaquia, cuidados especiais em relação à umidade do substrato e da estufa, aeração correta das raízes e nebulização (CALADO, 2003).

Pode ser constatado também que a presença de folhas nas estacas, tanto herbáceas quanto semilenhosas, é essencial para a sobrevivência e o enraizamento, conforme observado por Oliveira (2001). Além disso, a manutenção do aquecimento de substrato em temperaturas entre 23 e 26° C tem importância especial na formação de calos e primórdios de raízes. Porém, a homogeneidade na distribuição do calor na base das estacas é um fator de grande importância para a obtenção de resultados lineares.

A perlita é comprovadamente o substrato mais indicado para o enraizamento de estacas, dadas suas características de manutenção de volume após irrigação abundante, boa drenagem natural, aeração que proporciona nas estacas e baixa capilaridade (CALADO, 2003).

Sendo assim, o enraizamento de estacas em ambiente controlado vem a ser a alternativa mais recomendável atualmente para a oliveira. Negash (2003) estudou o enraizamento de estacas de oliveira-selvagem [*Olea europaea* subsp. *cuspidata* (Wall. ex. DC.) Ciffieri] e concluiu que

essa pode ser propagada por estaquia, porém, os danos ocasionados na planta matriz e o baixo enraizamento inviabilizam esse método. Já Sebastiani & Tognetti (2004), trabalhando com o enraizamento de estacas das oliveiras ‘Frantoio’ e ‘Gentile di Larino’, concluíram que essas cultivares apresentam baixo enraizamento, mesmo utilizando 4000 mg/L de AIB.

A técnica de propagação por estaquia da cultura da oliveira é um grande avanço em relação ao método de propagação tradicional, porém, exige grande controle dos parâmetros de temperatura, umidade, aquecimento basal e luminosidade, além de instalações de alta tecnologia, fatores que elevam o seu custo de produção.

4 CONCLUSÃO

A contaminação persistente dos explantes durante o cultivo *in vitro* e também durante os subcultivos sugere que a planta tenha associações com microrganismos endógenos.

Segundo revisão de literatura, para as culturas isentas de contaminações e oxidações foram identificadas a ocorrência de regeneração pela via indireta, com a indução de calo seguida da regeneração de brotos. Estes resultados implicam que é necessário estabelecer cultivos livres de contaminação, provavelmente, com o uso e doses corretas de antibióticos no meio de cultivo e, também, o uso de antioxidantes faz-se necessário para reduzir os índices de oxidação e necrose.

Portanto, o fato da alta taxa de contaminação e oxidação revelaram grandes entraves, assim como a não ocorrência de multiplicação *in vitro* e morfogênese, para a micropropagação clonal em larga escala desta espécie.

Para propagação da oliveira pelo método de estaquia torna-se necessário a instalação de um ambiente controlado e favorável às exigências da cultura quanto à temperatura, umidade e luminosidade.

O presente trabalho serviu como importante base de conhecimento para o desenvolvimento de pesquisas mais aprofundadas a respeito de métodos viáveis para produção comercial de oliveira.

Development of *in vitro* establishment techniques and rootship by cutting of three varieties of olive (*Olea europaea* L.)

Gabriela Fossatti

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea* L.) belongs to the family Oleaceae, being cultivated for its production of fruits for the extraction of olive oil and table olives, in addition to its great economic, social and cultural importance. It occurs mainly in the Mediterranean basin, being extended to several countries of the world. Brazil is the second largest importer of olive oil and the fourth largest importer of table olives. In this way, the additions of researches that promote improvements in the production and quality of the products become pertinent. As an alternative to these limitations, the present work had as objective the *in vitro* establishment of nodal segments, through different processes of disinfestation and composition of crop media and the induction of the rooting of young cuttings for the production of seedlings of three varieties of olive tree. The experiment was conducted at the Federal University of Santa Catarina, Curitibanos Campus. For the *in vitro* establishment of nodal segments different disinfestation tests were tested. *In vitro* induction, different culture medium compositions were tested, based on the MS and WPM saline formulations supplemented with BAP (1 μ M) and the use of the antibiotic Estreptomax (4 ml / L), to obtain aseptic cultures, as well as addition Ascorbic acid (250 mg / L), citric acid (150 mg / L) and activated charcoal (1.5 g / L) as antioxidants. In the rooting induction test, cuttings of young branches were used from parent plants of the three varieties kept in a greenhouse. Different concentrations of AIB (1000; 2000; 4000 ppm) were tested in trays containing light commercial substrate, kept in a greenhouse with temperature control and under intermittent irrigation. In the *in vitro* cultures evaluations, a persistent contamination of the explants and high oxidation was observed, suggesting that the plant is associated with endogenous contaminants and has recalcitrance *in vitro*. Disinfestation presented a better result when the antibiotic Streptomax was added and oxidation was controlled with the use of ascorbic acid and citric acid, in the manipulation of the cultures and addition of activated carbon in the culture medium. The use of the WPM salts provided a reduction of the phenolic oxidation in the inoculated olive tissues when compared to the MS medium. In the establishment by cuttings it was observed that the use of 4000 ppm of IBA, promoted the induction of the root system, in a stakes and a greater number with the beginning of callus formation. Oxidation was also observed in most cuttings with the use of 1000 ppm IBA. The present work served as an initial basis for the identification of cultivation techniques to improve, reduce costs and for further research to stimulate the cultivation of olive trees in Brazil, with varieties of high productivity for extraction of the oil and fruits with quality.

Key words: Plant tissue culture; Disinfestation; Micropropagation; Plant production.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16p. (Documentos 58, Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111;).
- BARRUETO CID, L.P.; ZIMMERMANN, M.J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 122).
- CALADO, M. L. **Alternativa para cultivares de difícil enraizamento**. Estação Nacional de Melhoramento de Plantas - Departamento de Olivicultura. Elvas, 2003.
- CANÇADO, G. M de A.; BRAGA, F. T.; SOUZA, R. A. V.; NUNES, C. F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. **Cultivo *in vitro* de oliveira e suas aplicações**. Capítulo 10. 2013. Disponível em:
<http://www.researchgate.net/profile/Geraldo_Cancado/publication/234047087_Cultivo_in_vitro_da_oliveira_e_suas_aplicaes/links/09e4150e89a8cea160000000.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** n.37, p.217-242, 1994.
- CROCE, D. M. Cultura da oliveira para o estado de Santa Catarina. **Sul Brasil Rural**, Chapecó, 22 ed., 2009.
- CROCE, D. M.; BRUGNARA, E. C.; OLIVEIRA, V. P.; DIAS, C. R. **Avaliação da produção e do rendimento de azeite das oliveiras ‘Arbequina’, ‘Arbosana’ e ‘Koroneiki’ em Santa Catarina**. Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v.29, n.1, p.54-57, jan./abr. 2015.
- DONATI, F. T. **Enraizamento de estacas de oliveira**. 2008. Disponível em:
<<http://tcc.bu.ufsc.br/CCATCCs/agronomia/ragr054.pdf>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.
- DONINI, L. P. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de oliveira para início da micropropagação**. Pelotas, 2009.
- DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.2, p.229-233, 2008.
- DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequina” para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1769-1772, set, 2008.
- DUTRA, L. F.; OLIVEIRA, A. F.; FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.220-223, 2004.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, 2003.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Edington: Exegetics, 2008. 479p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buzzo, J.A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol.1. Brasília, Embrapa, CNPH, 1998, pp. 183-260.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NEGASH, L. Vegetative propagation of the threatened African wild olive [*Olea europaea* L. subsp *cuspidata* (Wall. ex DC.) Cifffieri]. **New Forests**, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 137-146, Sept. 2003.

OLIVEIRA, A. F. de. **Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.)**. 2001. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

OLIVEIRA, A. F.; ALVARENGA, A. A.; CHALFUN, N. N. J.; GONÇALVES, F. S. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira em câmara úmida com aquecimento de substrato. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 40- 46, mar./abr. 2006.

OLIVEIRA, A. F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A.; RINCÓN, C. D. R. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.117-125, 2003.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de. R. e. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveiras (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.1, p.19-29, 2013.

PIO, R.; BASTOS, D.C.; BERTI, A.J.; SCARPANE FILHO, J.A.; MOURÃO FILHO, F.AA.; ENTELMANN, F.A.; ALVES, A.S.R.; NETO, J.E.B. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência Agrotecnológica**, v. 29, n. 3, p. 562-567, 2005.

RIBEIRO, F.C. et al. Produção e obtenção de mudas ou sementes. IN: COUTINHO, E.F; RIBEIRO, F.C.; CAPPELARO, T.H. **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 16. 2009 , pp.49-58.

RODRIGUES, M. A.; VELEZ, J. N.; REGATO, M. D. Multiplicação de Estacas de Oliveira sob Nebulização. Escola Superior Agrária de Beja, Portugal In: **III Simpósio Nacional de Olivicultura** - Castelo Branco, out. 2003.

ROUSSOS, P.A.; PONTIKIS, C.A. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.295-304, 2002.

RUGINI, E. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, v.24, n.2, p.123-134, 1984.

SANTOS, E.M.; AZEVEDO, B.O.M.; MARINHO, A.B.; CARVALHO, A.C.P.P. DE CASTRO, A.C.R.; SARAIVA, K.R. **Influência de diferentes tipos de substratos nas**

características físicas-foliares de bastão do imperador micropropagado. Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, v.9, n.1-2, p. 1-8, 2013.

SEBASTIANI, L.; TOGNETTI, R. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1-4, p. 75-82, Mar. 2004.

SILVA, A. L. ; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliqué à desporte-greffes de vigne in vitro. **Journal International Des Sciences de La Vigne EtDu Vin, Bordeaux** (França), v. 29, n. 1, p. 01-09, 1995.

SILVA, L. F. O; OLIVEIRA, A. F.; PIO, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Fitotecnia**, Campinas, v.71, n.2, p.202-209, 2012.

SOARES, Fernanda Pereira; PAIVA, Renato; ALVARENGA, Amauri Alves; NERY, Fernanda Carlota; VARGAS, Daiane Peixoto; SILVA, Douglas Ramos Guelfi. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 01, p.152-157, 2011.

SOUZA, J.A. et al. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1920- 1922, 2006.

STANDARDI, A.; MICHELI, M.; PICCIONI, E. Propagaziione "in vitro" dell'olivo: acquisizione e prospettive. **Rivista di Frutticoltura**, Bolonha, n. 7/8, p. 19-23, 1998.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics - A biometrical approach**. 2.ed., New York: Mcgraw-Hill Book, 1980. 633p.